

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2003-289884
 (43)Date of publication of application : 14.10.2003

(51)Int.Cl. C12N 15/09
 A01H 5/00
 C12N 1/15
 C12N 1/19
 C12N 1/21
 C12N 5/10
 C12N 9/10
 C12P 19/18

(21)Application number : 2003-024352 (71)Applicant : SUNTORY LTD
 (22)Date of filing : 31.01.2003 (72)Inventor : IIDA SHIGERU
 MORITA HIROMASA
 HOSHINO ATSUSHI
 ONO EIICHIRO

(30)Priority
 Priority number : 2002024574 Priority date : 31.01.2002 Priority country : JP

(54) GENE ENCODING NEW PROTEIN HAVING TRANSGLUCOSYLATION ACTIVITY

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a gene encoding a new protein having an activity of transferring glucose to a sugar moiety at the 3-position of a flavonoid, and a method for using the same.

SOLUTION: The gene is derived from, e.g. a morning glory, has a specific amino acid sequence and encodes the protein transferring the glucose to the sugar moiety at the 3-position of anthocyanin. A protein encoded with the gene is provided. A plant in which the gene is transduced produces a flower, or the like, having a color different from that of a natural plant by expression of the gene.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 04.01.2006
 [Date of sending the examiner's decision of rejection]
 [Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]
 [Date of final disposal for application]
 [Patent number]
 [Date of registration]
 [Number of appeal against examiner's decision of rejection]
 [Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開2003-289884

(P2003-289884A)

(43)公開日 平成15年10月14日 (2003.10.14)

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マコ-ド(参考)
C 1 2 N 15/09	Z NA	A 0 1 H 5/00	A 2 B 0 3 0
A 0 1 H 5/00		C 1 2 N 1/15	4 B 0 2 4
C 1 2 N 1/15		1/19	4 B 0 5 0
1/19		1/21	4 B 0 6 4
1/21		9/10	4 B 0 6 5

審査請求 未請求 請求項の数17 O L (全 18 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2003-24352(P2003-24352)

(22)出願日 平成15年1月31日 (2003.1.31)

(31)優先権主張番号 特願2002-24574(P2002-24574)

(32)優先日 平成14年1月31日 (2002.1.31)

(33)優先権主張国 日本 (JP)

(71)出願人 000001904

サントリー株式会社

大阪府大阪市北区堂島浜2丁目1番40号

(72)発明者 飯田 滋

愛知県岡崎市竜美南2-4-1-3-21

(72)発明者 森田 裕将

愛知県岡崎市竜美北2-3-4 鶴田ハイ

ツ3-B

(72)発明者 星野 敦

愛知県岡崎市竜美南2-2-1-8-33

(74)代理人 100077517

弁理士 石田 敬 (外3名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 新規糖転移活性を有する蛋白質をコードする遺伝子

(57)【要約】 (修正有)

【課題】 フラボノイドの3位の糖にグルコースを転移する活性を有する新規な蛋白質をコードする遺伝子及びその使用方法の提供。

【解決手段】 例えば、アサガオに由来する、特定のアミノ酸配列を有する、アントシアニンの3位の糖にグルコースを転移する蛋白質をコードする遺伝子、及びこの遺伝子によりコードされる蛋白質が提供される。この遺伝子が導入された植物は、この遺伝子の発現により、天然植物とは異なる色を有する花などをもたらす。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 フラボノイドの3位の糖にグルコースを転移する活性を有する蛋白質をコードする遺伝子。

【請求項2】 フラボノイドがアントシアニンである請求項1に記載の遺伝子。

【請求項3】 配列番号：2又は配列番号：14に記載のアミノ酸配列を有するフラボノイドの3位の糖にグルコースを転移する活性を有する蛋白質をコードする請求項1または2に記載の遺伝子。

【請求項4】 配列番号：2又は配列番号：14に記載のアミノ酸配列に対して1個又は複数個のアミノ酸の付加、欠失及び／又は他のアミノ酸による置換によって修飾されているアミノ酸配列を有し、且つフラボノイドの3位の糖にグルコースを転移する活性を有する蛋白質をコードする請求項1または2記載の遺伝子。

【請求項5】 配列番号：2又は配列番号：14に記載のアミノ酸配列に対して30%以上の同一性を有するアミノ酸配列を有し、且つフラボノイドの3位の糖にグルコースを転移する活性を有する蛋白質をコードする請求項1または2記載の遺伝子。

【請求項6】 配列番号：2又は配列番号：14に記載のアミノ酸配列をコードする塩基配列の全部または一部に対して、5 x SSC、50°Cの条件下でハイブリダイズにより得られ、且つフラボノイドの3位の糖にグルコースを転移する活性を有する蛋白質をコードする請求項1または2記載の遺伝子。

【請求項7】 配列番号：1又は配列番号：13に記載の塩基配列の全部または一部に対して、5 x SSC、50°Cの条件下でハイブリダイズにより得られ、且つフラボノイドの3位の糖にグルコースを転移する活性を有する蛋白質をコードする請求項1または2記載の遺伝子。

【請求項8】 フラボノイドの3位の糖がグルコースである請求項1～7のいずれか1項に記載の遺伝子。

【請求項9】 請求項1～8のいずれか1項に記載の遺伝子を含んでなるベクター。

【請求項10】 請求項9に記載のベクターにより形質転換された宿主。

【請求項11】 請求項1～8のいずれか1項に記載の遺伝子によってコードされる蛋白質。

【請求項12】 請求項1～9のいずれか1項に記載の遺伝子が導入された植物もしくはこれと同じ性質を有する該植物の子孫またはそれらの組織もしくは器官。

【請求項13】 請求項12に記載の植物又はこれと同じ性質を有するその子孫の切り花。

【請求項14】 請求項1～8のいずれか1項に記載の遺伝子を用いてフラボノイドの3位を修飾する方法。

【請求項15】 請求項1～8のいずれか1項に記載の遺伝子を用いる花色の調節方法。

【請求項16】 請求項10に記載の宿主を培養し、又は生育させ、そして該宿主からフラボノイドの3位の糖

にグルコースを転移する活性を有する蛋白質を採取することを特徴とする該蛋白質の製造方法。

【請求項17】 3位に糖を有するフラボノイドに、請求項11に記載の蛋白質を作用せしめて3位の糖にグルコースが転移したフラボノイドを製造する方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明はフラボノイドを配糖化する酵素遺伝子及びその利用方法に関するものである。

【0002】

【従来の技術】花卉産業においては顕花植物の新規あるいは多様性に富んだ新品種の開発が重要である。なかでも、花の色は花卉のもっとも重要な形質である。交配に頼った従来の育種により、さまざまな色の品種が育種されてきたが、交配可能な植物種の遺伝資源が限定されているため、単一の植物種がすべての色の品種を有することはまれである。

【0003】花の色の主な成分は、アントシアニンと総称されるフラボノイドの一群の化合物である。植物には多様なアントシアニンが存在することは知られており、それらの多くの構造が既に決定されている。アントシアニンの色は主としてその構造に依存している。アントシアニンの生合成に関わる酵素や遺伝子に関する研究が進んでおり、分子生物学的手法と植物への遺伝子導入により、アントシアニンの構造を変換し、花の色を変えた例もある (Holton et al. (1995) *Plant Cell*, 7, p. 1071, Tanaka et al. (1998) *Plant Cell Physiol.* 39, p1 119)。

【0004】アントシアニンの生合成はアントシアニジン3-グルコシドに至るまではほとんどの顕花植物で共通である。アントシアニジン3-グルコシドは種・品種に特異的な多様な修飾を受ける。この多様性が花色の多彩さの一因となっている。アントシアニンは中性溶液中では不安定な化合物であるが、糖やアシル基により修飾されることにより安定性が向上する。また、これら修飾がアントシアニンの溶解度に影響する。

【0005】また、これら修飾がアントシアニンの細胞内の分布、液胞内での分布にも影響し、結果として花色に影響する (Markham et al. *Phytochem.* 55, p327-336. (2000), Markham et al. *Phytochem.* 58, p403-413. (2001), Raymond Brouillard and Olivier Dangles. *Flavonoids and Flower colour*, p565-588. in *The Flavonoids*. J. B. Harborne (ED)). アシル基は、アントシアニジン骨格に直接結合するのではなく、その糖に結合するため、アントシアニンをアシル化するためには、アントシアニンが配糖化されている必要がある。

【0006】フラボノイドの配糖化に関してはいくつかの報告がある。アントシアニジンの3位の水酸基にグルコースを転移する反応を触媒する酵素の遺伝子は、キン

ギヨソウ、リンドウ、バラ、オオムギ、トウモロコシなどからクローニングされている (Tanaka et al. (1998) *Plant Cell Physiol.* 39, p1119)。また、アントシアニンの3位の水酸基にガラクトースを転移する反応を触媒する酵素の遺伝子はケツルアズキ (*Vigna mungo*) とペチュニアからクローニングされている (Mato et al. (1998) *Plant Cell Physiol.* 39, p1145; Miller et al. (1999) *J. Biol. Chem.* 273, p34011)。

【0007】さらに、アントシアニンの5位の水酸基にグルコースを転移する反応を触媒する酵素の遺伝子は、シソ、バーベナ、トレニアなどからクローニングされている (WO 99/05287公報)。アントシアニン3-グルコシドの3位のグルコースの6位の水酸基にラムノースを転移する反応を触媒する酵素 (UDP-ラムノース:アントシアニン3-グルコシド ラムノシリトランスフェラーゼ) の遺伝子はペチュニアからクローニングされている (Brugliera et al. (1994) *Plant J.* 5, p81)。

【0008】フラボノイドの7位の水酸基にグルコースを転移する反応を触媒する酵素の遺伝子は、オウゴンからクローニングされており、これを大腸菌で発現させた蛋白質はフラボノイドの7位にグルコースを転移する反応を触媒することが報告されている (Hirotani et al. (2000) *Planta* 210, p1006)。ベタニジンの5位の水酸基にグルコースを転移する反応を触媒する酵素の遺伝子がリビングストンデージーからクローニングされており、これを大腸菌で発現させた蛋白質はフラボノイドの4'位と7位の水酸基にグルコースを転移する反応を触媒することが示された (Vogt et al. (1999) *Plant J.* 19:509-519)。

【0009】また、アラビドブシスのゲノム配列が解明されたことにより、植物ゲノム中には多数の糖転移酵素遺伝子が存在することも明らかとなった (J Biol Chem 2001276 p4344)。また、糖転移酵素のアミノ酸配列は、程度は異なるが、相同性があり、スーパーファミリーを形成していること、同じ機能を持つ糖転移酵素のアミノ酸配列は植物種が異なっていても相同性が高くスーパーファミリーの中でファミリーを形成していること、一つのファミリーの中で異なる植物種由来の糖転移酵素のアミノ酸配列の同一性は30~50%以上であることが示されている (J Biol Chem 2001 276 p4344, *Planta* 2001 213 p164)。

【0010】アントシアニン3-グルコシドの糖に、グルコースを転移する酵素の活性が確認されたことはある (Forkmann (1999) *Comprehensive natural products chemistry* Vol 1. p. 713-748, Ed. Sankawa, Pergamon) が、酵素が精製されたこともないし、遺伝子がクローニングされたことはない。アサガオは (*Ipomea nil*) は日本において育種され、多種多様な変種が得られている。また、その連鎖地図も作成されており、花色や形態形成に関する遺伝子座が同定されている。そのうち、いくつ

かの遺伝子、たとえば、カルコン合成酵素、フラバノン3-水酸化酵素、ジヒドロフラボノール4-還元酵素等の遺伝子がクローニングされている (Annual. New York Acad. Sci. 1999, 870, p265)。

【0011】アサガオ花弁に含まれる主なアントシアニンはヘブンリーブルーアントシアニンと呼ばれる複雑に修飾されたアントシアニンであるペオニジン3-[2-[6-(3-グルコシルカフェイル) グルコシル]-6-(4-[6-(3-グルコシルカフェイル) グルコシル]カフェイル) グルコシド]-5-グルコシド (Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 1991, 30, 17) で、その構造からアントシアニン3-グルコシドの糖に、グルコースを転移する酵素が存在することは示唆されるが、その酵素活性が確認されたり、酵素が単離されたり、遺伝子がクローニングされたこともない。

【0012】

【特許文献1】WO 99/05287公報

【0013】

【非特許文献1】Holton et al. (1995) *Plant Cell*,

20 7, p. 1071

【非特許文献2】Tanaka et al. (1998) *Plant Cell Physiol.* 39, p1119

【非特許文献3】Markham et al. *Phytochem.* 55, p327-336. (2000)

【非特許文献4】Markham et al. *Phytochem.* 58, p403-413. (2001)

【非特許文献5】Raymond Brouillard and Olivier Dangles. *Flavonoids and Flowercolour*, p565-588. in *The Flavonoids*. J. B. Harborne (ED)

30 【非特許文献6】Tanaka et al. (1998) *Plant Cell Physiol.* 39, p1119

【0014】

【非特許文献7】Mato et al. (1998) *Plant Cell Physiol.* 39, p1145

【非特許文献8】Miller et al. (1999) *J. Biol. Chem.* 273, p34011

【非特許文献9】Brugliera et al. (1994) *Plant J.* 5, p81

【非特許文献10】Hirotani et al. (2000) *Planta* 210, p1006

40 【非特許文献11】Vogt et al. (1999) *Plant J.* 19:509-519

【非特許文献12】J Biol Chem 2001 276 p4344

【0015】

【非特許文献13】Planta 2001 213 p164

【非特許文献14】Forkmann (1999) *Comprehensive natural products chemistry* Vol 1. p. 713-748, Ed. Sankawa, Pergamon

【非特許文献15】Annual. New York Acad. Sci. 1999, 870, p265

【非特許文献16】Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 1991, 30, 17

【0016】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、フラボノイドの3位の糖にグルコースを転移する活性を有する蛋白質をコードする遺伝子、およびその用途、特に花色の調節方法を提供しようとするものである。

【0017】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、上記の課題を解決すべく種々研究した結果、アサガオのフラボノイドの3位の糖にグルコースを転移する活性を有する蛋白質をコードする遺伝子のクローニングに成功し、さらにこの遺伝子を植物に導入し、植物中で発現させる事に成功した。従って本発明は、フラボノイドの3位の糖にグルコースを転移する活性を有する蛋白質をコードする遺伝子を提供する。好ましくは、フラボノイドはアントシアニンである。

【0018】また、本発明は、配列番号：2又は配列番号：14に記載のアミノ酸配列を有するフラボノイドの3位の糖にグルコースを転移する活性を有する蛋白質をコードする遺伝子；配列番号：2又は配列番号：14に記載のアミノ酸配列に対して1個又は複数個のアミノ酸の付加、欠失及び／又は他のアミノ酸による置換によって修飾されているアミノ酸配列を有し、且つフラボノイドの3位の糖にグルコースを転移する活性を有する蛋白質をコードする遺伝子を提供する。

【0019】更に、本発明は、配列番号：2又は配列番号：14に記載のアミノ酸配列に対して30%以上の同一性を有するアミノ酸配列を有し、且つフラボノイドの3位の糖にグルコースを転移する活性を有する蛋白質をコードする遺伝子を提供する。更に、本発明は、配列番号：2又は配列番号：14に記載のアミノ酸配列をコードする塩基配列の全部または一部に対して、5×SSC、50°Cの条件下でハイブリダイズにより得られ、且つフラボノイドの3位の糖にグルコースを転移する活性を有する蛋白質をコードする遺伝子；或いは、配列番号：1又は配列番号：13に記載の塩基配列の全部または一部に対して、5×SSC、50°Cの条件下でハイブリダイズにより得られ、且つフラボノイドの3位の糖にグルコースを転移する活性を有する蛋白質をコードする遺伝子を提供する。

【0020】本発明はまた、前記何れかの遺伝子を含んでなるベクター、例えば発現ベクター又は遺伝子移行用（トランスファー）ベクター；及び該ベクターにより形質転換された宿主、例えば微生物宿主、またはトランジエニック植物を提供する。本発明は更に、上記何れかの遺伝子が導入された植物と同じ性質を有する該植物の子孫またはそれらの組織もしくは器官、例えば切り花を提供する。

【0021】本発明は更に、上記何れかに記載の遺伝子によってコードされる蛋白質、或いは上記の形質転換さ

れた宿主、例えば微生物宿主又はトランジエニック植物により生産される蛋白質を提供する。本発明は又、上記何れかの遺伝子を用いてフラボノイドの3位を修飾する方法を提供する。本発明はまた、上記何れかの遺伝子を用いる花色の調節方法、さらに、本発明は前記宿主を培養し、又は生育させ、そして該宿主からフラボノイドの3位の糖にグルコースを転移する活性を有する蛋白質を採取することを特徴とする該蛋白質の製造方法を提供する。また、本発明は、3位に糖を有するフラボノイドに、前記蛋白質を作用せしめて3位の糖にグルコースが転移したフラボノイドを製造する方法を提供する。

【0022】

【発明の実施の形態】本発明の遺伝子としては、例えば配列表の配列番号：2又は配列番号：14に記載するアミノ酸配列をコードするものが挙げられる。しかしながら、複数個のアミノ酸の付加、欠失および／又は他のアミノ酸との置換によって修飾されたアミノ酸配列を有する蛋白質も、もとの蛋白質と同様の酵素活性を維持することが知られている。従って本発明は、フラボノイドの3位の糖にグルコースを転移する活性を有している蛋白質である限り、配列番号：2又は配列番号：14に記載のアミノ酸配列に対して1個または複数個のアミノ酸配列の付加、欠失および／又は他のアミノ酸との置換によって修飾されたアミノ酸配列を有する蛋白質および当該蛋白質をコードする遺伝子も本発明に属する。複数個のアミノ酸とは、例えば数個のアミノ酸である。

【0023】本発明はまた、配列番号：2又は配列番号：14に記載のアミノ酸配列をコードする塩基配列の全部またはその一部、例えばコンセンサス領域の6個以上

のアミノ酸をコードする塩基配列、より具体的には配列番号：1又は配列番号：13に示す塩基配列の全部又は一部、例えばコンセンサス領域の6個以上のアミノ酸に対応する部分に対して、例えば5×SSC、50°Cの条件下でハイブリダイズし、且つフラボノイドの3位の糖にグルコースを転移する活性を有する蛋白質をコードする遺伝子に関するものである。なお、適切なハイブリダイゼーション温度は塩基配列やその塩基配列の長さによって異なり、例えばアミノ酸6個をコードする18塩基からなるDNAフラグメントをプローブとした場合には50°C以下の温度が好ましい。

【0024】このようなハイブリダイゼーションによって選択される遺伝子としては、天然由来のもの、例えば植物由来のもの、例えば、ダイコン、アカキヤベツ、キキョウ、コーンソリダ、カンパニュラ、ラーツスパー、ニンジン、ロベリア、ヤマノイモ、西洋アサガオ、サツマイモ、チョウマメ、エンドウマメ由来の遺伝子が挙げられるが、植物以外の由来であってもよい。また、ハイブリダイゼーションによって選択される遺伝子はcDNAであってもよく、ゲノムDNAであってもよい。

【0025】また、ナス科に属するペチュニアとナス由

来のフラボノイドの3位の糖転移酵素遺伝子は高い相同意性(72%)を示し、種が異なっても同一機能を有するフラボノイド糖転移酵素遺伝子は高い配列同一性を示すことが知られている。本発明はさらに配列番号:2又は配列番号:14に記載のアミノ酸配列に対して約30%以上、好ましくは約50%以上、より好ましくは約60%または約70%以上、さらに好ましくは約90%以上の同一性を有するアミノ酸配列を有し、且つフラボノイドの3位の糖にグルコースを転移する活性を有する蛋白質をコードする遺伝子の花色変換への利用に関するものである。

【0026】生来の塩基配列を有する遺伝子は実施例に具体的に示すように、例えばcDNAライブラリーのスクリーニングによって得られる。また、修飾されたアミノ酸配列を有する酵素をコードするDNAは生来の塩基配列を有するDNAを基礎として、常用の部位特定変異誘発やPCR法を用いて合成することができる。例えば修飾を導入したいDNA断片を生来のcDNAまたはゲノムDNAの制限酵素処理によって得、これを鋳型にして、所望の変異を導入したプライマーを用いて部位特異的変異誘発またはPCR法を実施し、所望の修飾を導入したDNA断片を得る。その後、この変異を導入したDNA断片を目的とする酵素の他の部分をコードするDNA断片と連結すればよい。

【0027】あるいはまた、短縮されたアミノ酸配列からなる酵素をコードするDNAを得るには、例えば目的とするアミノ酸配列より長いアミノ酸配列、例えば全長アミノ酸配列をコードするDNAを所望の制限酵素により切断し、その結果得られたDNA断片が目的とするアミノ酸配列の全体をコードしていない場合は、不足部分の配列からなるDNA断片を合成し、連結すればよい。

【0028】また、得られた遺伝子を大腸菌および酵母での遺伝子発現系を用いて発現させ、酵素活性を測定することにより、得られた遺伝子がフラボノイドの3位の糖にグルコースを転移する活性を有する蛋白質をコードすることを確認することができる。さらに、当該遺伝子を発現させることにより、遺伝子産物であるフラボノイドの3位の糖にグルコースを転移する活性を有する蛋白質を得ることができる。あるいはまた、配列番号:2又は配列番号:14に記載のアミノ酸配列を有する蛋白質に対する抗体を用いても、フラボノイドの3位の糖にグルコースを転移する活性を有する蛋白質を得ることができ、抗体を用いて他の生物からも、フラボノイドの3位の糖にグルコースを転移する活性を有する蛋白質をクローニングすることもできる。

【0029】従って本発明はまた、前述の遺伝子を含む組換えベクター、特に発現ベクター、及び当該ベクターによって形質転換された宿主に関するものである。宿主としては、原核生物または真核生物を用いることができる。原核生物としては細菌、例えばエシレリヒア(*Escherichia*)属に属する細菌、例えば大腸菌(*Escherichia coli*)、バシルス(*Bacillus*)属微生物、例えばバシ

ルス・スブチリス(*Bacillus subtilis*)など常用の宿主を用いることができる。真核性宿主としては、下等真核生物、例えば真核性微生物、例えば真菌である酵母または糸状菌が使用できる。

【0030】酵母としては、例えばサッカロミセス(*Saccharomyces*)属微生物、例えばサッカロミセス・セレビシエ(*Saccharomyces cerevisiae*)等が挙げられ、また糸状菌としてはアスペルギルス(*Aspergillus*)属微生物、例えばアスペルギルス・オリゼ(*Aspergillus oryzae*)、アスペルギルス・ニガー(*Aspergillus niger*)、ペニシリウム(*Penicillium*)属微生物が挙げられる。さらに動物細胞または植物細胞が使用でき、動物細胞としては、マウス、ハムスター、サル、ヒト等の細胞系が使用される。さらに昆虫細胞、例えばカイコ細胞、またはカイコの成虫それ自体も宿主として使用される。

【0031】本発明の発現ベクターはそれらを導入すべき宿主の種類に依存して発現制御領域、例えばプロモーターおよびターミネーター、複製起点等を含有する。細菌用発現ベクターのプロモーターとしては、常用のプロモーター、例えばtrcプロモーター、tacプロモーター、lacプロモーター等が使用され、酵母用プロモーターとしては、例えばグリセルアルデヒド3リン酸デヒドロゲナーゼプロモーター、PH05プロモーター等が使用され、糸状菌用プロモーターとしては例えばアミラーゼプロモーター、trpCプロモーター等が使用される。

【0032】また動物細胞宿主用プロモーターとしてはウイルス性プロモーター、例えばSV40アーリープロモーター、SV40レートプロモーター等が使用される。発現ベクターの作製は制限酵素、リガーゼ等を用いて常法に従って行うことができる。また、発現ベクターによる宿主の形質転換も常法に従って行うことができる。前記の発現ベクターによって形質転換された宿主を培養、栽培または生育し、培養物等から常法に従って、例えば、濾過、遠心分離、細胞の破碎、ゲル濾過クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー等により目的とする蛋白質を回収、精製することができる。

【0033】さらに本発明は、3位に糖を有するフラボノイドに、前記蛋白質を作用せしめて3位の糖にグルコースが転移したフラボノイドを製造する方法に関するものである。例えば、得られた遺伝子を発現させた植物、酵母、大腸菌等から、本酵素を取得し、それらにUDP-グルコースとフラボノイド3配糖体を加え、酵素反応を行うことでフラボノイド3位の糖にグルコースが付加されたフラボノイド3-ソフォロシドを製造することができる。

【0034】本明細書においてはアサガオ由来の遺伝子について述べているが、本発明はアサガオ由来の本遺伝子のみに限定されるものではなく、フラボノイドの3位の糖にグルコースを転移する活性を有する蛋白質をコードする遺伝子であれば、いずれの由来でもよい。すなわ

ち本発明の遺伝子の由来としては、植物でも動物でも微生物であってもよく、フラボノイドの3位の糖にグルコースを転移する活性を有していれば同様に花色変換へ利用できる。さらに本発明は、本発明の遺伝子を導入することによる、色合いが調節された植物もしくはその子孫又はこれらの組織に関するものであり、その形態は切り花であってもよい。

【0035】本発明で得られた遺伝子を用いると、アントシアニンの3位の糖にグルコースを転移する反応を促進したり、あるいはアントシアニンの3位の糖にグルコースを転移する反応を抑制することができ、結果として花の色を調節することができる。この際3位のソフトロースにアシル基を転移する活性を有する蛋白質をコードする遺伝子と併せて利用することもできる。本発明の遺伝子を、アシル基を転移する活性を有する蛋白質をコードする遺伝子と併用することにより、本発明の遺伝子により付加された糖にさらにアシル基を転移することができる。アシル基が付加することにより、安定性が向上するので、本発明の遺伝子単独で用いるよりも、より青い花色を有する植物を作出することもできる。

【0036】また、植物に遺伝子を導入し、該遺伝子を構成的あるいは組織特異的に発現させることは可能であり、またアンチセンス法やコサプレッショングなどによって目的の遺伝子の発現を抑制することも可能である。形質転換可能な植物の例としては、バラ、キク、カーネーション、金魚草、シクラメン、ラン、トルコギキョウ、フリージア、ガーベラ、グラジオラス、カスミソウ、カラソコエ、ユリ、ペラルゴニウム、ゼラニウム、ペチュニア、トレニア、チューリップ、イネ、オオムギ、小麦、ナタネ、ポテト、トマト、ポプラ、バナナ、ユーカリ、サツマイモ、タイズ、アルファルファ、ルーピン、トウモロコシ、カリフラワーなどがあげられるこれらに限定されるものではない。

【0037】

【実施例】以下実施例に従って、発明の詳細を述べる。分子生物学的手法はとくに断らない限り、Molecular Cloning(Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001)に依った。

【0038】実施例1. アサガオDNA断片の増幅

アサガオ系統KK/ZSK-2 (Inagaki Y., et al. Plant Cell 16, 375-383) のツボミからRNAを回収し、プライマーN otI d (T) 18 (5' -AACTGGAAAGATTGGCGCCGAGGAATTTT TTTTTTTTTTTT-3') (配列番号：3) をプライマーとして、逆転写反応を行った。逆転写物を錆型とし、プライマーATC(5' -GA(CT)TT(CT)GGITGGGGIAA-3') (配列番号：4) とプライマーNotI(5' -AACTGGAAAGATTGGCGCCG CAGGAA-3') (配列番号：5) とをプライマーにしてPCR反応を行った。反応は、94°Cにて1分間保持した後、94°Cにて30秒、55°Cにて30秒、72°Cにて1分からなるサイクルを30サイクル行い、さらに72°Cで1分間保持した。

これにより得られたDNA断片をKAT5とした。その配列を、配列番号：6に示す。

【0039】実施例2. 遺伝子のスクリーニング

KK/FP-39 (マルバアサガオの系統 (Iida S., et al. Modification of Gene Expression and Non-Mendelian Inheritance, NIAR/STA, Tsukuba, p. 23-40)) からmRNAを抽出し、λ ZAPIIをベクターとするdirectional cDNAライブラリー作製キット (ストラタジーン社) を用いて製造者の推奨する方法でcDNAライブラリーを作製した。5. 10 0×10^6 のブラークをP³²でラベルしたKAT5でスクリーニングした。ハイブリダイゼーションは、6×SSC、0.5%のSDS、40%ホルムアミド中で37°Cにて15時間行った。その後、3×SSC、0.5%のSDS中で5分間室温にて洗浄し、同じ洗浄液で室温にて15分間洗浄した。

【0040】洗浄液を3×SSC、0.5%のSDSに変更し、37°Cで45分間洗浄した後、3×SSC、0.5% SDS 中でさらに60°Cで45分間洗浄した。しかしながら、明瞭にプローブにハイブリダイズしたクローンは得ることができなかつた。かすかにハイブリダイズした12クローンを単離し、

20 DNA塩基配列を決定した。その内の一つのクローンKAT5-1は、ペチュニアの遺伝子座RtにコードされるUDP-ラムノース：アントシアニジン3-グルコシドラムノシリル転移酵素遺伝子(以下、RT) (Plant J. 1994 5 p69 Plant J. 1994 5 p81) と弱い相同性が見られた。アミノ酸の同一性は37%であった。

【0041】KAT5-1のcDNA部分の塩基配列を配列表の配列番号：1に示し、塩基配列から推定されるアミノ酸配列を配列表の配列番号：2に示す。アサガオのアントシアニンの構造からは、アントシアニンラムノシリル基転移酵素が存在するとは考えられず、本遺伝子の機能を決定するために、鋭意研究を行った。

【0042】実施例3. 実施例2で得られた遺伝子の大腸菌での発現

以下の手順でKAT5-1にコードされる糖転移酵素遺伝子を大腸菌で発現した。KAT5-1を錆型とし、プライマー 3GG T Nco I (5' -CCCATGGTTCTCAAGCAACAACTTAC-3') (配列番号：7) とプライマー2GT 500R (5' -CGGGAAACTGGCCG GAGC-3') (配列番号：8) とをプライマーとし、Taq polymerase (TaKaRa) を用いて、PCR (反応条件：94°Cにて30秒、60°Cにて30秒、72°Cにて30秒を1サイクルとした反応を30回繰り返した後、72°Cで7分間保持。) を行った。

【0043】得られた約500bpのDNA断片をNcoIとHaeIIとで消化して得たDNA断片と、KAT5-1をHaeIIとKpn Iとで消化して得られた約1200bpのDNA断片と、NcoIとKpn Iで消化した大腸菌発現ベクターpQE61(QIAGEN)とをライゲーションし、得られた大腸菌用発現プラスミドをpQE61KAT5-1とした。

【0044】pQE61KAT5-1を大腸菌JM105株に導入し、50 この大腸菌を37°Cで一晩前培養した後、前培養液の一部

を400mLの本培養液に植菌し、27°CでOD₆₀₀ =0.6になるまで培養した。KAT5-1遺伝子の発現誘導のため、最終濃度0.4mMとなるようにイソプロピルベータチオガラクトシド(IPTG)を加え、さらに27°Cで一晩培養した。菌体を集菌し、洗浄後、20mLの破碎用緩衝液(25mM Tris-HCl(pH7.5)、250mM NaCl、1mM EDTA、0.5%2-メルカプトエタノール)に懸濁し、そして懸濁液を超音波処理することによって菌体を破壊した。菌体破壊液の上清をKAT5-1粗抽出液として以下で述べる反応に用いた。

【0045】実施例4. KAT5-1遺伝子産物による糖付加活性能の確認

20μLの実施例3で得られたKAT5-1粗抽出液、10μLの0.5M リン酸カリウム(pH7.5)、20μLの5mM UDP-グルコース、30μLの蒸留水、及び20μLのデルフィニジン3-グルコシド(1.5mg/mL)を混合し、30°Cにて15分間保持した。その後、1N-HClを最終濃度0.16Nとなるように添加し、反応を停止した。反応液に90%CH₃CN/1%TFAを50μL加え高速液体クロマトグラフィー(HPLC)で分析した。HPLCカラムは、Asahipak-ODP-50(6mmφX250mm、昭和電工)、移動相として、A液 0.5%トリフルオロ酢酸(TFA)水溶液、B液0.5%TFAを含む50%アセトニトリルを用いた。

【0046】溶出は、A液:B液=9:1の混合液からA液:B液=5:5の混合液の直線濃度勾配を20分で行った。流速は、0.6mL/分とした。また、検出は520nmの吸光度を用いた。その結果、基質であるデルフィニジン3-グルコシドのピーク(リテンションタイム:13.2分)に加え、リテンションタイムが11.7分である新しいピークが検出された。従って、この化合物は、デルフィニジン3-グルコシドに糖が付加されたものであると考えられる。また、基質にシアニジン3-グルコシド(リテンションタイム:14.1分)を用いた場合においても新たなピーク(リテンションタイム:12.6分)が得られたことから、KAT5-1遺伝子産物は、デルフィニジンおよびシアニジン3-グルコシドを基質として利用できる糖転移能を持つ酵素であると考えられる。

【0047】実施例5. 植物での発現

KAT5-1遺伝子産物の植物体での機能を明らかにするために、KAT5-1遺伝子を構成的に発現するためのバイナリーベクター(pSPB1002)を構築し、花弁にシアニジン3-グルコシドを含有するペチュニア(品種:バカラレッド、サカタのタネ社)を形質転換し、その結果得られた形質転換体の花弁を用いて色素分析を行った。pSPB1002の作製は以下のように行った。

【0048】バイナリーベクターpBE2113-GUS(Mitsuhara et al. Plant Cell Physiol. 37, p49)をSnaBIで消化し、BamHIリソマリーゼを挿入した。生じたプラスミドをSacIで消化し、平滑末端化し、さらにSalIリソマリーゼを挿入した。生じたプラスミドをEcoRIとHindIIIで消化し、得られる約2kbのDNA断片をバイナリーベクターpBINPLU

S(van Engelen et al. Plant Mol. Biol. 15, p373)のEcoRI-HindIII部位に挿入し、プラスミドpSPB176を得た。一方、クローンKAT5-1のプラスミドをBamHIとXbaIで消化し、約1.64kbのDNA断片を得た。この断片を、pSPB176のBamHI-SalI部位に挿入し、pSPB1002とした。

【0049】次に、pSPB1002を用いて、リーフディスクを用いるアグロバクテリウム法により、ペチュニア(品種バカラレッド、サカタのタネ社)を形質転換し、約50系統の形質転換個体を得た。形質転換の方法は公知の方法(Plant J. 1994 5 p81)によった。

【0050】得られた個体が形質転換体であることを調べるために、それぞれの形質転換体からゲノミックDNAを抽出し、DNA20μgをBamHIで消化し、電気泳動後、Hybond N+メンブレン(Amersham)にプロッティングを行い、ジゴキシゲニン(DIG)で標識したKAT5-1遺伝子をプローブに用いてサザンハイブリダイゼーションを行った。DIGシステムを用いたサザンハイブリダイゼーション法は製造業者(ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社)が推奨する条件に倣った。その結果、得られた個体が独立した形質転換体であることを確認した。

【0051】次に導入したKAT5-1遺伝子の発現レベルを確認するために定量的RT-PCR解析を行った(Plant J. 1998 13, p475)。独立した形質転換体の花弁から全RNAを抽出した後、この全RNA 1μgを錠型として逆転写を行い、cDNAを得た。cDNA合成は、SuperScriptTM First-Strand Synthesis System for RT-PCR(GIBCO BRL)を利用し、合成条件は本システム製造業者が推奨する条件に倣った。

【0052】得られたcDNAを錠型にして、KAT5-1特異的プライマーであるPn3GGT-F; 5'-atg ggt tct caa gca aca act tac(配列番号:9)及びPn3GGT-R; 5'-tttatat cgc cac cga act tca tta(配列番号:10)を用いて、PCR反応を行った。また、導入遺伝子(KAT5-1)発現量と内在遺伝子発現量とを比較するために、比較対象としてペチュニアのグリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素(Pet GAPDH)遺伝子を採用し、それを特異的に増幅するプライマーとしてPet Gapdh-F; ggt cgtttg gtt gca aga gt(配列番号:11)及びPet Gapdh-R; ctg gtt att cca ttacaa cta(配列番号:12)を用いた。

【0053】PCR反応としては、94°C4分の熱変性の後に、94°Cにて1分、55°Cにて1分、及び72°Cにて2分の反応を12サイクル行った。PCR産物を、前述のサザンハイブリダイゼーションの際と同様の方法でメンブレンにプロッティングし、DIGラベルのKAT5-1またはPetGAPDHをプローブに用いてハイブリダイゼーションを行った。その結果、独立した形質転換体においてKAT5-1の過剰発現を確認した。

【0054】形質転換体からの花弁約0.5gを、50%アセトニトリル、0.1%TFAで抽出しアントシアニンをHPLCで分析した結果、9.5-47.5% (A520nmにおける全アントシ

アニン量に対する割合) のシアニジン 3-ソフォロシド (ポリフェノールラボラトリリーズ社) と同じ15.0分に溶出する物質のピークが検出された。なおアントシアニンのHPLC分析条件は以下の通りである。

【0055】カラムはShodex DE-413L (4.6mm*250mm) を用いて、移動相として0.5%TFA含有、アセトニトリル10%から50%のグラジエント15分の後、50%アセトニトリル10分間溶出を行った。また、流速は0.6ml/minで行った。検出は島津photo diode array検出器SPD-M10AVPを用いて250-600nmのスペクトルをとり、A520nmで定量した。また、このシアニジン 3-ソフォロシドの量は形質転換体におけるKAT5-1の発現量と正の相関があった。

【0056】HPLCで同定した生成物のピークがシアニジン3-ソフォロシドであることを確認するため、同ピークを分取し、そしてMSによる分析を行った。MSはThermo quest社のLC-Qシステムを用い、ESI、ポジティブモードで測定した。その結果、KAT5-1形質転換体花弁で生成された物質は分子量が611 ([M]⁺ m/z) であり、シアニジン 3-ソフォロシドが生成していることが確認された。以上により、KAT5-1はアントシアニジン 3-グルコシドのグルコースに対してグルコースを転移し、アントシアニジン 3-ソフォロシドを生成する糖転移酵素をコードする遺伝子であることが示された。

【0057】実施例6.アサガオ由来ライブラリー: KK/ZSK-2 buds cDNA library (Gene 226 (1999) 181-188.) に対してKAT5-1をプローブに実施例2と同様のスクリーニングを行った。その結果、50000プランクあたり約25のポジティブなシグナルが得られ、このうち単離を行ったクローンの中から、もっとも長い5' 非翻訳領域 *

* をもつPNGT1-7の塩基配列の解析を行った。PNGT1-7の塩基配列を配列表の配列番号: 1 3に示し、塩基配列から推定されるアミノ酸配列を配列表の配列番号: 1 4に示す。

【0058】PNGT1-7にコードされる遺伝子および遺伝子産物はマルバアサガオ由来KAT5-1と比べ、DNAレベルで97%の同一性、アミノ酸レベルで99%の同一性を示し、両者は極めて類似しておりPNGT1-7はKAT5-1同様の機能を有するものと考えられる。また、ノザンハイブリ

10 ダイゼーションにより野生型系統KK/ZSK-2の蓄積に於いてPNGT1-7mRNAの蓄積を示す結果が得られた。

【0059】さらに、花の色素合成遺伝子群の発現に異常(減少)が見られるアサガオの変異体において、PNGT1-7遺伝子の発現も同様に発現が低下している結果が得られた。従って、PNGT1-7遺伝子は、花の色素合成系に関わる遺伝子と同じ発現制御下にあることが類推され、KAT5-1との相同意性からしても、デルフィニイン及びシアニジン 3-グルコシドを基質として利用できる糖転移酵素であると考えられる。

20 【0060】

【発明の効果】本発明により、アントシアニジン3-グルコシドにグルコースを転移する反応を触媒する活性を有する蛋白質をコードする遺伝子をはじめてクローニングでき、花弁で発現させることができた。本蛋白質を花弁で発現させたり、コサブレッショング法等を用いて、活性を抑制することにより、アントシアニンの構造と花色を変えたりすることができる。

【0061】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Suntory Limited
 <120> Gene encoding a novel protein having transglycosylation activity
 <130> 1015025
 <160> 12
 <210> 1
 <211> 1665
 <212> DNA
 <213> Ipomoea purpurea
 <220>
 <221> SDS
 <222> (31)…(1407)
 <223> Nucleotide sequence encoding an amino acid sequence of a protein having an activity to transfer glucose to sugar at position 3 of flavonoids
 <400> 1
 cagaaagcta gctagcttgg tataggaagt atg ggt tct caa gca aca act tac 54
 Met Gly Ser Gln Ala Thr Thr Tyr
 1 5
 cac atg gct atg tat ccc tgg ttt ggt gtc ggc cat ctc acc ggt ttc 102
 His Met Ala Met Tyr Pro Trp Phe Gly Val Gly His Leu Thr Gly Phe

15	16	
10	15	20
ttc cgc ctc gcc aac aaa cta gcc ggt aag ggt cat cgc atc tcc ttc		150
Phe Arg Leu Ala Asn Lys Leu Ala Gly Lys Gly His Arg Ile Ser Phe		
25	30	35
ttg atc ccc aaa aac act caa tcc aag ctt gaa tct ttc aat ctt cac		198
Leu Ile Pro Lys Asn Thr Gln Ser Lys Leu Glu Ser Phe Asn Leu His		
45	50	55
cca cac ctc att tcc ttt gtt ccc atc gtc gtg cca tcc att ccc ggc		246
Pro His Leu Ile Ser Phe Val Pro Ile Val Val Pro Ser Ile Pro Gly		
60	65	70
ctc cct ccc ggc gcc gag acc act tcc gat gtc ccc ttt cct tcc acc		294
Leu Pro Pro Gly Ala Glu Thr Thr Ser Asp Val Pro Phe Pro Ser Thr		
75	80	85
cat cta ctc atg gag gct atg gac aaa acc cag aac gac att gag atc		342
His Leu Leu Met Glu Ala Met Asp Lys Thr Gln Asn Asp Ile Glu Ile		
90	95	100
atc ctc aaa gat ctc aaa gtg gac gtt gtg ttc tat gat ttt acc cac		390
Ile Leu Lys Asp Leu Lys Val Asp Val Val Phe Tyr Asp Phe Thr His		
105	110	115
tgg cta ccc agc ctg gca cgg aag atc ggg atc aaa tca gta ttc tac		438
Trp Leu Pro Ser Leu Ala Arg Lys Ile Gly Ile Lys Ser Val Phe Tyr		
125	130	135
agc acc att agt ccg ctc atg cat ggc tac gct tta tcc ccg gag cgg		486
Ser Thr Ile Ser Pro Leu Met His Gly Tyr Ala Leu Ser Pro Glu Arg		
140	145	150
aga gtc gtc ggg aaa cag tta act gaa gcc gac atg atg aaa gct ccg		534
Arg Val Val Gly Lys Gln Leu Thr Glu Ala Asp Met Met Lys Ala Pro		
155	160	165
gcc agt ttc ccg gac ccg tct atc aag ctc cat gct cac gag gcg cgg		582
Ala Ser Phe Pro Asp Pro Ser Ile Lys Leu His Ala His Glu Ala Arg		
170	175	180
gga ttt act gct agg acg gta atg aag ttc ggc ggc gat ata act ttc		630
Gly Phe Thr Ala Arg Thr Val Met Lys Phe Gly Gly Asp Ile Thr Phe		
185	190	195
ttt gac cgg atc ttt act gcg gtg agt gaa agt gat ggt ttg gcg tac		678
Phe Asp Arg Ile Phe Thr Ala Val Ser Glu Ser Asp Gly Leu Ala Tyr		
205	210	215
agt act tgc cgg gag att gaa ggc caa ttc tgc gac tac ata gaa acc		726
Ser Thr Cys Arg Glu Ile Glu Gly Gln Phe Cys Asp Tyr Ile Glu Thr		
220	225	230
cag ttt caa aaa cct gtc cta ctc gcc ggc cca gct tta cca gtc cca		774
Gln Phe Gln Lys Pro Val Leu Leu Ala Gly Pro Ala Leu Pro Val Pro		
235	240	245
tcc aaa tcc acc atg gaa cag aaa tgg tcg gat tgg ctg ggg aaa ttc		822
Ser Lys Ser Thr Met Glu Gln Lys Trp Ser Asp Trp Leu Gly Lys Phe		
250	255	260
aag gaa ggc tct gtt ata tac tgc gca ttt ggg agc gaa tgc acc ctg		870
Lys Glu Gly Ser Val Ile Tyr Cys Ala Phe Gly Ser Glu Cys Thr Leu		
265	270	275
cgc aag gat aag ttc cag gaa tta ctc tgg ggt tta gag ctc aca gga		918

(10)

特開2003-289884

17

18

Arg Lys Asp Lys Phe Gln Glu Leu Leu Trp Gly Leu Glu Leu Thr Gly
 285 290 295 966
 atg cca ttc ttt gct gcc ctg aaa cca cca ttc gaa acc gag tca gtc
 Met Pro Phe Phe Ala Ala Leu Lys Pro Pro Phe Glu Thr Glu Ser Val
 300 305 310 310
 gaa gca gcc atc ccg gag gag ctg aag gag aaa ata caa gga aga ggg 1014
 Glu Ala Ala Ile Pro Glu Glu Leu Lys Glu Lys Ile Gln Gly Arg Gly
 315 320 325
 atc gta cat ggc gaa tgg gtt caa cag caa ctg ttt ctc cag cac cca 1062
 Ile Val His Gly Glu Trp Val Gln Gln Leu Phe Leu Gln His Pro
 330 335 340
 tcc gtg ggc tgc ttt gtg agc cac tgc ggg tgg gct tct ctg tca gaa 1110
 Ser Val Gly Cys Phe Val Ser His Cys Gly Trp Ala Ser Leu Ser Glu
 345 350 355 360
 gca ctg gtt aat gat tgc caa atc gtg ctc ttg ccg cag gta gga gat 1158
 Ala Leu Val Asn Asp Cys Gln Ile Val Leu Leu Pro Gln Val Gly Asp
 365 370 375
 caa att atc aac gca aga atc atg agt gtg agc ctg aaa gtt ggg gtg 1206
 Gln Ile Ile Asn Ala Arg Ile Met Ser Val Ser Leu Lys Val Gly Val
 380 385 390
 gag gtg gag aaa ggg gaa gaa gat ggg gtg ttt tca aga gag agt gta 1254
 Glu Val Glu Lys Gly Glu Asp Gly Val Phe Ser Arg Glu Ser Val
 395 400 405
 tgc aag gca gtg aaa gct gtg atg gat gaa aag agt gag ata ggg aga 1302
 Cys Lys Ala Val Lys Ala Val Met Asp Glu Lys Ser Glu Ile Gly Arg
 410 415 420
 gaa gta aga ggc aac cat gac aag tta aga ggt ttc ttg atg aat gca 1350
 Glu Val Arg Gly Asn His Asp Lys Leu Arg Gly Phe Leu Met Asn Ala
 425 430 435 440
 gat ctg gat tca aag tac atg gac tct ttc aat cag aaa ctg cag gat 1398
 Asp Leu Asp Ser Lys Tyr Met Asp Ser Phe Asn Gln Lys Leu Gln Asp
 445 450 455
 ctc ctt gga tgaatataat ataataataat attaatggc atcactgccc 1447
 Leu Leu Gly
 tgagctagaa tgggttttagc tagggttttg gttttcttga aaaaatgcataataagaagt 1507
 gcaagctaat taagagaata tatatatata tatatatata tgcattgcagg tgtgtgtgt 1567
 tttagcttga tctgtataat aaaggattt atttatcaat gaaagcaact gatatttagg 1627
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1665
 <210> 2
 <211> 459
 <212> PRT
 <213> Ipomoea purpurea
 <220>
 <223> An amino acid sequence of a protein having an activity to transfer
 glucose to sugar at position 3 of flavonoids
 <400> 2
 Met Gly Ser Gln Ala Thr Thr Tyr His Met Ala Met Tyr Pro Trp Phe
 1 5 10 15
 Gly Val Gly His Leu Thr Gly Phe Phe Arg Leu Ala Asn Lys Leu Ala
 20 25 30

19

20

Gly Lys Gly His Arg Ile Ser Phe Leu Ile Pro Lys Asn Thr Gln Ser
 35 40 45
 Lys Leu Glu Ser Phe Asn Leu His Pro His Leu Ile Ser Phe Val Pro
 50 55 60
 Ile Val Val Pro Ser Ile Pro Gly Leu Pro Pro Gly Ala Glu Thr Thr
 65 70 75 80
 Ser Asp Val Pro Phe Pro Ser Thr His Leu Leu Met Glu Ala Met Asp
 85 90 95
 Lys Thr Gln Asn Asp Ile Glu Ile Ile Leu Lys Asp Leu Lys Val Asp
 100 105 110
 Val Val Phe Tyr Asp Phe Thr His Trp Leu Pro Ser Leu Ala Arg Lys
 115 120 125
 Ile Gly Ile Lys Ser Val Phe Tyr Ser Thr Ile Ser Pro Leu Met His
 130 135 140
 Gly Tyr Ala Leu Ser Pro Glu Arg Arg Val Val Gly Lys Gln Leu Thr
 145 150 155 160
 Glu Ala Asp Met Met Lys Ala Pro Ala Ser Phe Pro Asp Pro Ser Ile
 165 170 175
 Lys Leu His Ala His Glu Ala Arg Gly Phe Thr Ala Arg Thr Val Met
 180 185 190
 Lys Phe Gly Gly Asp Ile Thr Phe Phe Asp Arg Ile Phe Thr Ala Val
 195 200 205
 Ser Glu Ser Asp Gly Leu Ala Tyr Ser Thr Cys Arg Glu Ile Glu Gly
 210 215 220
 Gln Phe Cys Asp Tyr Ile Glu Thr Gln Phe Gln Lys Pro Val Leu Leu
 225 230 235 240
 Ala Gly Pro Ala Leu Pro Val Pro Ser Lys Ser Thr Met Glu Gln Lys
 245 250 255
 Trp Ser Asp Trp Leu Gly Lys Phe Lys Glu Gly Ser Val Ile Tyr Cys
 260 265 270
 Ala Phe Gly Ser Glu Cys Thr Leu Arg Lys Asp Lys Phe Gln Glu Leu
 275 280 285
 Leu Trp Gly Leu Glu Leu Thr Gly Met Pro Phe Phe Ala Ala Leu Lys
 290 295 300
 Pro Pro Phe Glu Thr Glu Ser Val Glu Ala Ala Ile Pro Glu Glu Leu
 305 310 315 320
 Lys Glu Lys Ile Gln Gly Arg Gly Ile Val His Gly Glu Trp Val Gln
 325 330 335
 Gln Gln Leu Phe Leu Gln His Pro Ser Val Gly Cys Phe Val Ser His
 340 345 350
 Cys Gly Trp Ala Ser Leu Ser Glu Ala Leu Val Asn Asp Cys Gln Ile
 355 360 365
 Val Leu Leu Pro Gln Val Gly Asp Gln Ile Ile Asn Ala Arg Ile Met
 370 375 380
 Ser Val Ser Leu Lys Val Gly Val Glu Val Glu Lys Gly Glu Glu Asp
 385 390 395 400
 Gly Val Phe Ser Arg Glu Ser Val Cys Lys Ala Val Lys Ala Val Met
 405 410 415
 Asp Glu Lys Ser Glu Ile Gly Arg Glu Val Arg Gly Asn His Asp Lys
 420 425 430

21

22

Leu Arg Gly Phe Leu Met Asn Ala Asp Leu Asp Ser Lys Tyr Met Asp
 435 440 445

Ser Phe Asn Gln Lys Leu Gln Asp Leu Leu Gly

450 455

<210> 3

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221>

<222>

<223> Primer NotId(T)

<400> 3

aacttggaga attcgccggcc gcagggattt tttttttttt ttttt 45

<210> 4

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221>

<222>

<223> Primer ATC

<400> 4

gayttyggit ggggiaa 17

<210> 5

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221>

<222>

<223> Primer NotI

<400> 5

aacttggaga attcgccggcc gcagggaa 27

<210> 6

<211> 472

<212> DNA

<213> 472

<220>

<223> Nucleotide sequence cloned from Ipomoea nil

<400> 6

gactttgggt gggggaaagcc aagactgggt gtcaatatgc tcgataattc atgggtgctt 60

ttcttagacg ccattaatgg agcagtagaa gtgtggatga aattgcctaa gcaagttatg 120

cacacattaa cgcaagaccg ccactttctt gcctatgtt ctgccttcc taaacccaaag 180

ctttaataac aatgaattaa acaacgtaac tggcatttg cgaaaccag ggtggtagg 240

aagctcttat ctggctaaag gcacgacgaca ttaattctgt agtcgtggaa tctgattgt 300

tgaatctgtt ttcttattttt aattttttt tgcgtgatt ttttctatgt aggtactatt 360

attnaagcaat gttgatcaat tgctatggat attagtact ttgtgtcaa aaaaaaaaaa 420

aaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaa aaaaattccct gcggccgcga attcttcag tt 472

<210> 7

23

24

<211> 28
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <221>
 <222>
 <223> Primer 3GGT NcoI
 <400> 8
 ccccatgggt tctcaagcaa caacttac
 <210> 8
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <221>
 <222>
 <223> Primer 2GT 500R
 <400> 8
 cgggaaactg gccggagc
 <210> 9
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <221>
 <222>
 <223> Primer Pn3GGT-F
 <400> 9
 atgggttctc aagcaacaac ttac
 <210> 10
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <221>
 <222>
 <223> Primer Pn3GGT-R
 <400> 10
 ttatatcgcc accgaacttc atta
 <210> 11
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <221>
 <222>
 <223> Primer Pet Gapdh-F
 <400> 11
 ggtcggttgg ttgcaagagt
 <210> 12

28

18

24

24

20

25

26

<211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <221>
 <222>
 <223> Primer Pet Gapdh-R
 <400> 12
 ctggttattc cattacaact a 21
 <210> 13
 <211> 1603
 <212> DNA
 <213> Ipomoea nil
 <220>
 <221> SDS
 <222> (31)…(1407)
 <223> Nucleotide sequence encoding an amino acid sequence of a protein having an activity to transfer glucose to sugar at position 3 of flavonoids
 <400> 13
 cagaaaagcta gctagctagg tataggaagt atg ggt tct caa gca aca act tac 54
 Met Gly Ser Gln Ala Thr Thr Tyr
 1 5
 cac atg gct atg tat ccc tgg ttt ggc gtc ggc cat ctc acc ggt ttc 102
 His Met Ala Met Tyr Pro Trp Phe Gly Val Gly His Leu Thr Gly Phe
 10 15 20
 ttc cgc ctc gcc aat aaa cta gcc ggt aaa ggt cac cgc atc tcc ttc 150
 Phe Arg Leu Ala Asn Lys Leu Ala Gly Lys Gly His Arg Ile Ser Phe
 25 30 35 40
 ttg atc ccc aaa aac act caa tcc aag ctt gaa tct ttc aac ctt cac 198
 Leu Ile Pro Lys Asn Thr Gln Ser Lys Leu Glu Ser Phe Asn Leu His
 45 50 55
 cca cac ctc att tcc ttt gtt ccc atc gtc gta ccg tcc att ccc ggc 246
 Pro His Leu Ile Ser Phe Val Pro Ile Val Val Pro Ser Ile Pro Gly
 60 65 70
 ctc cct ccc ggc gcc gag acc act tcc gat gtc ccc ttt cct tcc acc 294
 Leu Pro Pro Gly Ala Glu Thr Thr Ser Asp Val Pro Phe Pro Ser Thr
 75 80 85
 cat cta ctc atg gag gcc atg gac aaa acc cag aac gac att gag atc 342
 His Leu Leu Met Glu Ala Met Asp Lys Thr Gln Asn Asp Ile Glu Ile
 90 95 100
 atc ctc aaa gat ctc aaa gtg gat gtt gtg ttc tat gat ttt acc cac 390
 Ile Leu Lys Asp Leu Lys Val Asp Val Val Phe Tyr Asp Phe Thr His
 105 110 115 120
 tgg cta ccc agc ctg gca cgg aag atc ggg atc aaa tca gta ttc tac 438
 Trp Leu Pro Ser Leu Ala Arg Lys Ile Gly Ile Lys Ser Val Phe Tyr
 125 130 135
 agc acc atc agt ccg ctc atg cat ggc tac gct tta tcc ccg gag cgg 486
 Ser Thr Ile Ser Pro Leu Met His Gly Tyr Ala Leu Ser Pro Glu Arg
 140 145 150

(15)

特開2003-289884

27

28

aga gtc gtc ggg aaa cag tta act gaa gcc gac atg atg aaa gct ccg 534
 Arg Val Val Gly Lys Gln Leu Thr Glu Ala Asp Met Met Lys Ala Pro
 155 160 165
 gcc agt ttc ccg gac ccg tcg atc aag ctc cat gct cac gag gcg cgg 582
 Ala Ser Phe Pro Asp Pro Ser Ile Lys Leu His Ala His Glu Ala Arg
 170 175 180
 ggg ttt act gct agg acg gta atg aag ttc ggt ggc gat ata act ttc 630
 Gly Phe Thr Ala Arg Thr Val Met Lys Phe Gly Gly Asp Ile Thr Phe
 185 190 195 200
 ttt gac ccg att ttc acg gcg gtg agt gaa agt gat ggt ttg gcg tac 678
 Phe Asp Arg Ile Phe Thr Ala Val Ser Glu Ser Asp Gly Leu Ala Tyr
 205 210 215
 agt act tgc ccg gag att gaa ggc caa ttc tgt gac tac ata gaa acc 726
 Ser Thr Cys Arg Glu Ile Glu Gly Gln Phe Cys Asp Tyr Ile Glu Thr
 220 225 230
 cag ttt caa aaa cct gtc cta ctc gcc ggc cca gct tta cca gtc cca 774
 Gln Phe Gln Lys Pro Val Leu Leu Ala Gly Pro Ala Leu Pro Val Pro
 235 240 245
 tcc aaa tcc acc atg gaa cag aaa tgg tcg gat tgg ctg ggg aaa ttc 822
 Ser Lys Ser Thr Met Glu Gln Lys Trp Ser Asp Trp Leu Gly Lys Phe
 250 255 260
 aag gaa ggc tct gtt ata tac tgc gca ttt ggg agc gaa tgc acc ctg 870
 Lys Glu Gly Ser Val Ile Tyr Cys Ala Phe Gly Ser Glu Cys Thr Leu
 265 270 275 280
 cgc aag gat aag ttc cag gaa tta ctc tgg ggt tta gag ctc aca gga 918
 Arg Lys Asp Lys Phe Gln Glu Leu Leu Trp Gly Leu Glu Leu Thr Gly
 285 290 295
 atg cca ttc ttt gct gcc ctg aaa cca cca ttc gaa gcc gaa tca atc 966
 Met Pro Phe Phe Ala Ala Leu Lys Pro Pro Phe Glu Ala Glu Ser Ile
 300 305 310
 gaa gca gcc atc ccc gag gag ctg aag gag aaa ata caa gga aga ggg 1014
 Glu Ala Ala Ile Pro Glu Glu Leu Lys Glu Ile Gln Gly Arg Gly
 315 320 325
 atc gta cat ggc gaa tgg gtt caa cag caa ctg ttt ctc cag cat cca 1062
 Ile Val His Gly Glu Trp Val Gln Gln Leu Phe Leu Gln His Pro
 330 335 340
 tct gtc ggc tgc ttt gtg agc cac tgc ggg tgg gct tca ctg tca gaa 1110
 Ser Val Gly Cys Phe Val Ser His Cys Gly Trp Ala Ser Leu Ser Glu
 345 350 355 360
 gca ctg gta aat gat tgc caa atc gtg ctt ttg ccg cag gta gga gat 1158
 Ala Leu Val Asn Asp Cys Gln Ile Val Leu Leu Pro Gln Val Gly Asp
 365 370 375
 caa att atc aac gca aga atc atg agt gtg agc ctg aaa gtt ggg gtg 1206
 Gln Ile Ile Asn Ala Arg Ile Met Ser Val Ser Leu Lys Val Gly Val
 380 385 390
 gag gtg gag aaa ggg gaa gaa gat ggg gtg ttt tca aga gag agt gta 1254
 Glu Val Glu Lys Gly Glu Asp Gly Val Phe Ser Arg Glu Ser Val
 395 400 405
 tgc aag gca gtg aaa gct gtg atg gat gaa aag agt gag ata ggg aga 1302
 Cys Lys Ala Val Lys Ala Val Met Asp Glu Lys Ser Glu Ile Gly Arg

29

30

410	415	420	
gaa gta aga ggc aac cat gac aag tta aga ggt ttc ttg ttg aat gca			1350
Glu Val Arg Gly Asn His Asp Lys Leu Arg Gly Phe Leu Leu Asn Ala			
425	430	435	440
gat ctg gat tca aag tac atg gac tct ttc aat cag aaa ctg cag gat			1398
Asp Leu Asp Ser Lys Tyr Met Asp Ser Phe Asn Gln Lys Leu Gln Asp			
445	450	455	
ctc ctt gga tgaatataat ataataataat attaatttgtt atcactgcct tgagctagaa			1457
Leu Leu Gly			
tggtttagc tagggttttg gttttcttga aaaaatgcat aataagaat gcaagcta			1517
taagagaata tatatatata tatgcatgca ggtgtgggt gtttgagctt gatctgtaaa			1577
aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaa			1603
Ipomoea purpurea			
<210> 14			
<211> 459			
<212> PRT			
<213> Ipomoea nil			
<220>			
<223> An amino acid sequence of a protein having an activity to transfer			
glucose to sugar at position 3 of flavonoids			
<400> 14			
Met Gly Ser Gln Ala Thr Thr Tyr His Met Ala Met Tyr Pro Trp Phe			
1	5	10	15
Gly Val Gly His Leu Thr Gly Phe Phe Arg Leu Ala Asn Lys Leu Ala			
20	25	30	
Gly Lys Gly His Arg Ile Ser Phe Leu Ile Pro Lys Asn Thr Gln Ser			
35	40	45	
Lys Leu Glu Ser Phe Asn Leu His Pro His Leu Ile Ser Phe Val Pro			
50	55	60	
Ile Val Val Pro Ser Ile Pro Gly Leu Pro Pro Gly Ala Glu Thr Thr			
65	70	75	80
Ser Asp Val Pro Phe Pro Ser Thr His Leu Leu Met Glu Ala Met Asp			
85	90	95	
Lys Thr Gln Asn Asp Ile Glu Ile Ile Lys Asp Leu Lys Val Asp			
100	105	110	
Val Val Phe Tyr Asp Phe Thr His Trp Leu Pro Ser Leu Ala Arg Lys			
115	120	125	
Ile Gly Ile Lys Ser Val Phe Tyr Ser Thr Ile Ser Pro Leu Met His			
130	135	140	
Gly Tyr Ala Leu Ser Pro Glu Arg Arg Val Val Gly Lys Gln Leu Thr			
145	150	155	160
Glu Ala Asp Met Met Lys Ala Pro Ala Ser Phe Pro Asp Pro Ser Ile			
165	170	175	
Lys Leu His Ala His Glu Ala Arg Gly Phe Thr Ala Arg Thr Val Met			
180	185	190	
Lys Phe Gly Gly Asp Ile Thr Phe Phe Asp Arg Ile Phe Thr Ala Val			
195	200	205	
Ser Glu Ser Asp Gly Leu Ala Tyr Ser Thr Cys Arg Glu Ile Glu Gly			
210	215	220	
Gln Phe Cys Asp Tyr Ile Glu Thr Gln Phe Gln Lys Pro Val Leu Leu			

(17)

特開2003-289884

31

32

225	230	235	240												
Ala	Gly	Pro	Ala	Leu	Pro	Val	Pro	Ser	Lys	Ser	Thr	Met	Glu	Gln	Lys
245															
Trp	Ser	Asp	Trp	Leu	Gly	Lys	Phe	Lys	Glu	Gly	Ser	Val	Ile	Tyr	Cys
260															
Ala	Phe	Gly	Ser	Glu	Cys	Thr	Leu	Arg	Lys	Asp	Lys	Phe	Gln	Glu	Leu
275															
Leu	Trp	Gly	Leu	Glu	Leu	Thr	Gly	Met	Pro	Phe	Phe	Ala	Ala	Leu	Lys
290															
Pro	Pro	Phe	Glu	Ala	Glu	Ser	Ile	Glu	Ala	Ala	Ile	Pro	Glu	Glu	Leu
305															
Lys	Glu	Lys	Ile	Gln	Gly	Arg	Gly	Ile	Val	His	Gly	Glu	Trp	Val	Gln
325															
Gln	Gln	Leu	Phe	Leu	Gln	His	Pro	Ser	Val	Gly	Cys	Phe	Val	Ser	His
340															
Cys	Gly	Trp	Ala	Ser	Leu	Ser	Glu	Ala	Leu	Val	Asn	Asp	Cys	Gln	Ile
350															
Val	Leu	Leu	Pro	Gln	Val	Gly	Asp	Gln	Ile	Ile	Asn	Ala	Arg	Ile	Met
365															
Ser	Val	Ser	Leu	Lys	Val	Gly	Val	Glu	Val	Glu	Lys	Gly	Glu	Glu	Asp
380															
Gly	Val	Phe	Ser	Arg	Glu	Ser	Val	Cys	Lys	Ala	Val	Lys	Ala	Val	Met
400															
Asp	Glu	Lys	Ser	Glu	Ile	Gly	Arg	Glu	Val	Arg	Gly	Asn	His	Asp	Lys
415															
Leu	Arg	Gly	Phe	Leu	Leu	Asn	Ala	Asp	Leu	Asp	Ser	Lys	Tyr	Met	Asp
430															
Ser	Phe	Asn	Gln	Lys	Leu	Gln	Asp	Leu	Leu	Gly					
445															
							450								

フロントページの続き

(51) Int. Cl.	識別記号	F I	テーマコード' (参考)
C 1 2 N	5/10	C 1 2 P	19/18
	9/10	C 1 2 N	15/00
C 1 2 P	19/18	5/00	Z NAA
			A

(72) 発明者 小埜 栄一郎
 大阪府三島郡島本町若山台1丁目1番1号
 サントリー株式会社研究センター内

F ターム(参考) 2B030 AA02 AB04 AD12 CA17 CB03
CG05
4B024 AA08 BA10 BA79 CA01 DA01
DA02 DA05 DA06 DA11 EA04
GA11 GA17 HA08
4B050 CC03 DD13 EE10 LL10
4B064 AF52 BG00 CA02 CA05 CA10
CA11 CA19 CB30 CC24 DA11
4B065 AA01X AA26X AA57X AA87X
AA89Y AB01 AC14 AC20
BA02 CA53